

ANAIIS

EICTI 2017

6º Encontro de
Iniciação Científica

2º Encontro de Iniciação
ao Desenvolvimento
Tecnológico e Inovação

4 a 6 de outubro de 2017

Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)
Av. Tarquínio Joslin dos Santos, nº 1000
Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil



Realização:



Apoio:



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PESQUISA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE LIPASES DE FUNGOS
ISOLADOS DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU.**

PINTO, Felipe Justiniano.

Estudante do Curso de Biotecnologia, bolsista IC-FA - ILACVN – UNILA;

E-mail: fj.pinto.2016@aluno.unila.edu.br;

GONÇALVES, Caroline da Costa Silva.

Docente de Química Orgânica - ILACVN – UNILA;

E-mail: caroline.goncalves@unila.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Em 2013 o mercado mundial de enzimas alcançou cerca de 4,8 bilhões de dólares e deverá atingir os 7,1 bilhões em 2018, um crescimento anual de 8%. Havendo uma ampla aplicação biotecnológica, as enzimas lipolíticas se destacam no cenário, onde a hidrólise de ésteres e lipídeos tem papel fundamental. O grande interesse em enzimas lipolíticas está no fato de não precisarem de cofatores, apresentarem elevados índices de estereoespecificidade e uma boa estabilidade, podendo catalisar diferentes tipos de biotransformações, podendo ser utilizadas por exemplo na produção de biocombustíveis, síntese de fármacos, processamento de alimentos, entre outras. As aplicações industriais de enzimas isoladas são comumente limitadas pelos elevados custos de produção e baixa estabilidade enzimática, de forma que a imobilização celular é uma alternativa viável para a condução de bioprocessos, de forma eficaz, barata e de fácil aplicação industrial.

2. METODOLOGIA

Neste trabalho a atividade lipolítica de quatro fungos (M2CE1, M1CN62, M1BN64, MIANG65), isolados de rios da região de Foz do Iguaçu, foram avaliadas, a

metodologia foi dividida em duas etapas, sendo elas: cultivo em bucha vegetal e fermentação em estado sólido.

2.1 Cultivo em bucha vegetal

Para preparação do meio de cultivo, a esponja vegetal foi cortada em cubos (5-7 mm), para ser utilizada como suporte sólido, foi fervida duas vezes em água destilada e seca em estufa (60°C) até peso constante. Em seguida, 1,5g de esponja seca foi transferida para um erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio basal (1,4g de peptona, 0,02g de Ca(NO₃), 0,01g de MgSO₄, 0,02g de KH₂PO₄ e 500μL de azeite de oliva). O meio de cultivo foi autoclavado e reservado. Os micro-organismos foram cultivados em meio sólido MEA por 72h a 30°C. Após este período, as células foram transferidas, com estilete, para tubos falcon, pesadas e diluídas com água destilada esterilizada até concentração de 5mg/mL em um agitador vortex. Adicionou-se 0,750μL do inóculo ao meio de cultivo, que foi mantido sob agitação a 180rpm e 30°C por 48h em shaker. Após este período as células imobilizadas na esponja foram lavadas com água de torneira (2x de 30s), transferidas para tubos falcon, liofilizadas por 24h e armazenadas a 4°C. Para produção de lipases foi utilizada a metodologia de Fermentação em Estado Sólido (FES), empregando palha de arroz e farelo de trigo (1:1), como substrato sólido, peptona como fonte de nitrogênio e azeite (oliva ou dendê) como indutor.

2.2 Fermentação em estado sólido

Ao meio de cultivo (10g de palha de arroz triturada, 10g de farelo de trigo, 500μL de azeite, 200mg de peptona e 20mL de água destilada) foi adicionado 500μL de inóculo (5mg/mL), sendo este mantido sob agitação a 180rpm e 30°C por 72h. Após este período, foi adicionado ao meio de cultivo 40mL de tampão fosfato pH 7,3 contendo 1% de Triton X-100 e a mistura resultante foi mantida sob agitação a 180rpm por 1h. A mistura foi então filtrada em gaze dupla e o filtrado centrifugado a 5000rpm e 4°C por 4min. O sobrenadante foi utilizado como bruto enzimático e armazenado em geladeira a 4°C. As atividades lipolíticas dos brutos enzimáticos dos fungos, foi avaliada em dois pHs diferentes (pH 7,0 e 8,0) e na presença ou ausência de solvente orgânico (DMSO e DMF), utilizando-se a sonda fluorescente LIP como substrato enzimático. Os ensaios foram realizados em triplicadas e montados em plaquinhas de 96 poços, sendo utilizado 50μL do bruto enzimático, 10μL de uma solução aquosa de NaIO₄ (21,5mg/mL), 10μL da sonda, 80μL de solução de BSA (5mg/mL em tampão) e 50μL de tampão. O controle enzimático foi realizado pela substituição da sonda por

50µL de tampão, o controle positivo foi realizado pela substituição da sonda por igual volume do produto da mesma (diol) e para o controle negativo o bruto enzimático foi substituído por igual volume de tampão. As plaquinhas foram mantidas sob agitação orbital a 180rpm e 30°C até o momento da leitura em aparelho, para os ensaios de cinética as plaquinhas foram mantidas no próprio aparelho.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As lipases encontram-se disponíveis em células microbianas, células vegetais e tecidos animais. As lipases microbianas são frequentemente mais utilizadas que as lipases derivadas de plantas ou animais devido à grande variedade de atividades catalíticas. A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triglicerídeos, porém, em condições em que a água no meio é reduzida, a maioria das lipases é capaz de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação, entre outras. Por constituírem tal versatilidade, são visadas com grande importância em aplicações de indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, entre outras aplicações. A transesterificação enzimática consiste na modificação lipídica realizada pelas lipases e possuem uma vantagem significativa, permitem maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. No processo, a fase pesada (glicerol) é separada da fase leve (biodiesel) e não há a necessidade de neutralização do produto final, o que reduz a duração do processo. Este processo enzimático, utiliza-se de matérias primas que contem valor alto de ácidos graxos livres, onde estes são completamente transformados em biodiesel, sendo um processo sustentável em relação a catálise química. Os esforços de investigação de novas formas de energia, tem sido orientado por haver um aumento da demanda por biocombustíveis que se caracteriza por: benefícios que a expansão da utilização dos biocombustíveis pode trazer para o setor agrícola por meio da implantação de novos projetos, visando promover o desenvolvimento regional sustentável, redução da emissão de gás carbônico, aumentos contínuos da principal fonte de energia atual, petróleo, além da possível escassez do mesmo em um período de tempo, por ser uma fonte de energia não-renovável.

4. RESULTADOS

As atividades enzimáticas mostraram-se sensíveis ao pH, havendo uma maior conversão da sonda LIP em pH 7,0, contudo, a adição de solvente orgânico não

influenciou as atividades enzimáticas e ambos os azeites mostraram-se eficientes como indutores de atividade lipolítica. Adicionalmente, a viabilidade de imobilização física das células íntegras dos fungos em biomassa de esponja vegetal está sendo avaliada. A imobilização de células em partículas de biomassa porosa ocorre naturalmente durante o cultivo dos microrganismos em meio basal e nenhum procedimento adicional para purificação das lipases se faz necessário. Experimentos iniciais de imobilização física das células dos fungos isolados de riachos da região de Foz do Iguaçu em biomassa de esponja vegetal mostraram uma boa taxa de crescimento e imobilização das células. Encontra-se em andamento estudos de otimização das condições experimentais de imobilização (quantidade de biomassa, volume de indutor, tipo de indutor) das células dos fungos em esponja vegetal, para posterior testes de produção de biodiesel, no processo de transesterificação.

5. CONCLUSÃO

Mediante o explicitado neste trabalho, podemos observar que é de extrema viabilidade a imobilização de fungos em esponja vegetal, uma vez que possui um período longo de armazenamento útil, podendo ser ativados a qualquer instante, as lipases ativadas dos fungos em questão possuem um mercado amplo de aplicação, o que é fundamental para a região, já que o oeste do Paraná, e o estado como um todo, possui uma variabilidade de campos para tal aplicação. Os benefícios do uso das lipases como catalisador de reações para produção de biocombustíveis é uma alternativa viável, rápida e com baixo custo em relação a mais comum utilizada hoje em dia, com catálise química.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. **Quim. Nova** 2008, 31, 1932.

GONÇALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J. **Quim. Nova** 2014, 37, 1028.

SUN, S. Y.; XU, Y. **Process Biochem.** 2008, 43, 219.

BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUNOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. **Biochem. Eng. J.** 2001, 8, 39.

HASAN, F.; SHAH, A. A. HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 393, p. 235-251, 2006.